

PRODUCCIÓN DE HORMONA DEL CRECIMIENTO BOVINO POR *PICHIA PASTORIS*

HUGO L. GALLARDO B., CELIA N. SÁNCHEZ D., GERARDO R. PADILLA R., HUGO A. BARRERA S.*

Las hormonas del crecimiento (GHs) o somatotropinas (STs) representan una familia de proteínas producidas en los somatotropos de la hipófisis anterior. La importancia económica que representan fue la motivación inicial para tratar de aislarlas, purificarlas y ensayar su actividad biológica en 1944.¹ La GH bovina fue la primera GH purificada a partir de hipófisis y, a pesar de que los resultados fueron halagadores, la limitación fuente natural frenó su desarrollo comercial. Sin embargo, la idea se retomó con el surgimiento de la tecnología del DNA recombinante en los años setenta del siglo pasado.² Como consecuencia de ello, los primeros esfuerzos para clonar genes de GHs estuvieron precisamente centrados en las somatotropinas de interés económico: la humana, o HGH (1979),³ y la bovina o BGH (1980).⁴



Fig.1. Representación gráfica del modelo tridimensional hipotético de la BGH. La estructura tridimensional de BGH fue deducida por comparación con la PGH y con la isoforma de 22 kDa HGH, considerando los cambios aminoacídicos presentes en la BGH.⁶

La BGH es un polipéptido de 190 residuos aminoacídicos, constituida de cuatro hélices alfa y cuatro cisteínas involucradas en los dos enlaces disulfuro (figura 1) que participan en la estabilidad de la estructura tridimensional de la hormona. Se ha encontrado que el extremo *N-terminal* puede iniciar ya sea en el residuo de fenilalanina, como lo hacen el resto de las GHs, de otras especies, o en un residuo aminoacídico anterior (-1) correspondiente a alanina.⁵

También se ha descrito otro polimorfismo, pero en este caso en el codón 126, dando como resultado dos formas, que tienen importancia en la producción de leche (pues el genotipo homocigótico en dicho codón en el ganado Holstein es leucina, mientras que en el ganado Jersey es valina; con un diferencial de producción de leche en los dos casos del 2%).⁷

La disponibilidad de la BGHr ha permitido numerosos estudios de laboratorio y de campo. El impacto en los animales tratados se da en el incremento de la producción lechera y en el aprovechamiento del alimento, lo que en los países con sobreproducción de leche permite la reducción del número de animales requeridos en el hato y el consecuente ahorro en los gastos de mantenimiento, alimento, agua, medicamentos, etc. También se reduce la producción de estiércol, metano y nitrógeno.⁸

* Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los objetivos de este trabajo fueron la construcción de clonas de *Pichia pastoris* productoras de BGH y la evaluación de su capacidad de producción.

Material y métodos

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se empleó la DNA polimerasa *Pfu* con actividad correctora, siguiendo las recomendaciones sugeridas por la compañía Stratagene. El programa de PCR fue: paso 1, 5 min a 95°C; paso 2, 10 seg a 94°C; paso 3, 1 min a 60°C; paso 4, 2.5 min a 72°C; paso 5, 25 ciclos del paso 2 al 4; y paso 6, 10 min a 72°C.

Se purificó el producto de la PCR con el sistema «Clear Cut» para eliminar la *Pfu*, dNTPs, oligonucleótidos, reactivos y fragmentos menores a 200 nucleótidos. Posteriormente, se digirió dicho producto amplificado, junto con el DNA circular del vector pPIC9hGH22k, con las enzimas de restricción *Xho I* y *Avr II*. Estas enzimas reconocen sitios tanto en el sitio múltiple de clonación ("polylinker") del vector pPIC9hGH22k, a ambos lados del casete expesor, como en los extremos del producto amplificado (figura 2).

Los primeros indicadores fueron diseñados para contener en su secuencia los ya mencionados sitios de restricción. Ajustando a una relación molar 1:3 de vector-inserto, y se dio un tratamiento térmico a 65°C/20 min. Luego se dirigió la mezcla con *Xho I* y *Avr II* por 16 h a 37°C.

Después se comprobó por análisis electroforético que la digestión del vector fuera total (al observar sólo el vector linealizado). Se le aplicó una extracción con fenol/sevag y una precipitación con etanol. Se ligaron los fragmentos como la enzima DNAligasa de la compañía New England Biolabs. Posteriormente el producto de la ligación se transformó en bacterias calcio competentes. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas que contenían medio LB más ampicilina, a una concentración de 200 mg/mL, y fueron incubadas a 37 grados C de temperatura. En estas placas se observó crecimiento de colonias a las 18 hrs, las cuales fueron resembradas en tubos de 18X150 mm que en su interior contaban con 4 ml de medio LB y 4 µL de antibiótico (ampicilina); y se les incubó por 18 hrs a 37°C, con movimiento constante de 150 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se sometieron a un proceso de extracción selectivo de ADN

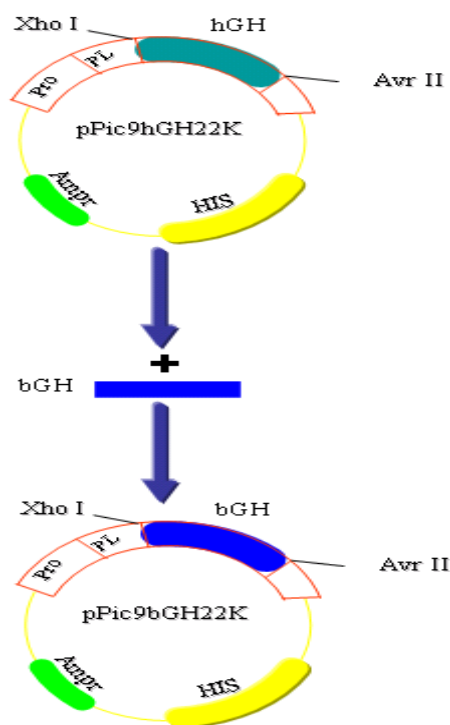


Fig. 2. Diseño del vector recombinante pPIC9bGH22k. Se ilustra la estrategia seguida para reemplazar el casete expesor de GH humana por el de la bovina en el plásmido en cuestión.

plasmídico. Éste se realizó con la técnica de lisis alcalina,⁹ y se verificaron tanto la concentración como la calidad del ADN plasmídico.

Las clonas fueron discernidas mediante PCR, utilizando los iniciadores que flanquean el sitio múltiple de clonación del vector (pPIC9). El paso siguiente fue secuenciar las clonas que en un análisis electroforético daban el tamaño en la amplificación; y una vez comprobada la integridad nucleica se transformó la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, empleando la técnica de esferoplastos (Invitrogen). Nuevamente se verificó la integración del vector de expresión de BGH en el genoma de las clonas resultantes de la transformación, con la técnica de PCR a partir de lisados celulares directos.

Las primeras fermentaciones se realizaron en 5 mL de medio BMM pH 6 en un tubo Falcon de 50 mL (1/10 de volumen) por 120 hrs, añadiendo metanol a una concentración final de 0.75% cada 24 hrs (condiciones ajustadas para la producción de HGH22kDa en *P. pastoris*).¹⁰ Muestras diarias del medio de cultivo de cada fermentación (2 mL),

antes de la siguiente inducción se dializaron y las proteínas recuperadas de las diálisis fueron precipitadas con metanol-acetona. La pastilla obtenida fue reconstituida en un volumen 20 veces menor que el original (100 µl) con amortiguador de aplicación. Las muestras fueron resueltas por electroforesis en geles de poliacrilamida discontinuos (4 y 12%) en condiciones desnaturalizantes.

Posteriormente se fermentaron las levaduras recombinantes a varios pH (2.3, 5.15, 6.0 y 8.0), en los diferentes tipos de medio de cultivo (amortiguado, sin amortiguar, con o sin casaminoácidos) y concentración de metanol (0.5 o 0.75%).

Resultados

Los oligonucleótidos seleccionados permitieron amplificar por PCR el ADNc de BGH y modificarlo durante la amplificación, para facilitar su inserción correcta en el vector de integración para *P. pastoris*. Dichos oligonucleótidos flanquearon los extremos 5' y 3' del ADNc de BGH.

Se amplificó el ADNc de BGH con la polimerasa *Pfu* bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (Stratagene). Con el producto de la reacción de ligación de los fragmentos de ADN generados de la digestión del vector pPIC9hGH22k y del producto amplificado del ADNc de BGH digeridos con *Xho* I y *Avr* II, se procedió a transformar las bacterias competentes (Cepa *XL1-Blue* de *E. coli*). Se seleccionaron al azar 36 clones. A los cultivos obtenidos se les practicaron minipreparaciones de ADN, resolviendo una pequeña alícuota (1 µl) de cada una en gel de agarosa al 0.6%. Para diferenciar las clonas *pPIC9bGHPuf*, *pPIC9* y las *pPIC9hGH22k*, los ADNs plasmídicos se trataron con la endonucleasa de restricción *Bgl* II y se analizaron los patrones electroforéticos en gel de agarosa al 1% (figura 3).

De la transformación de esferoplastos se obtuvieron entre 1,000 y 10,000 clones por ensayo. Se seleccionaron cuatro clones de cada transformación y se les comprobó la integración del cassette de expresión (*pPIC9bGHPfu*) por electroforesis en gel de agarosa al 1%, de las amplificaciones por PCR al lisado celular, y se encontró que solamente dos clones no integraron el casete de expresión.

El análisis de los geles donde se resolvieron las proteínas del medio (SDS-PAGE) reveló la presencia de una banda de un peso molecular aproximado de 22kDa (en las clonas inducidas con metanol),

demonstrando la presencia de BGHr secretada al medio de cultivo, la cual no se observó en la inducción de la clona control GS115.

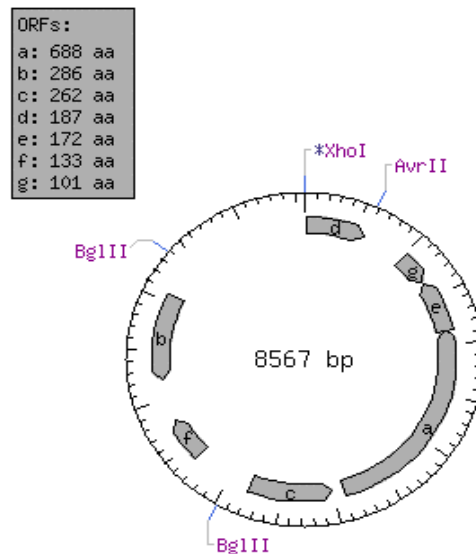


Fig. 3. Modelo utilizado para la caracterización de las posibles clonas. El plásmido contiene la secuencia nucleotídica que codifica para la hormona del crecimiento bovina (Frac. d).

Se realizaron varias fermentaciones en matraz y se pudo observar que todas las variables estudiadas en esta cepa recombinante influyen en los niveles de expresión de la BGH.

El análisis de los resultados nos indicó que las variables analizadas alteran la producción de BGHr, su pureza respecto a las proteínas totales y la densidad celular. El pH 8.0 y metanol al 0.875% permitieron la mayor producción (55 cuentas/mm² y pureza del 11%) de los ensayos; seguido de las condiciones de pH 6.0 y 1.5% de metanol, de producción (41 cuentas/mm² y pureza del 9%); y las condiciones de pH 5.15 y metanol al 0.875% permitieron una producción aceptable (27 cuentas/mm²) pero con una pureza mayor (21%).

Discusión

Con los resultados obtenidos en esta investigación se concluyó que existen diferencias de producción cuantificables entre BGHr y HGHr, y que el pH del medio y el porcentaje de metanol inductor sí influyen en la producción de las GHs. Estos resultados nos indican que aún falta realizar más ensayos de

fermentación y comprar distintas condiciones de fermentación, con el fin de seguir incrementando la producción.^{11,12,13,14}

Otros factores también importantes que pondrían estar afectando la producción son: el impedimento estérico en el sitio de corte de la prehormona, las propiedades fisicoquímicas de las BGHr, las estructuras secundarias del *RNAm* de BGH, y las regiones con alto contenido de A+T que puedan simular señales de terminación de la transcripción prematuras, entre otras.

Conclusiones

En las condiciones de fermentación ajustadas previamente para la HGhr no se favorece la producción de la BGhr. Las modificaciones permitieron incrementar la estabilidad, producción y pureza de BGhr en el medio de cultivo, comprobando que estos parámetros dependen de varios factores como el pH, la composición del medio, la forma de procesarla y las condiciones de almacenamiento. Los resultados sugieren que la BGhr es susceptible a la degradación fotoquímica y/o proteolítica en el medio de cultivo en ciertas condiciones.

Agradecimientos

Agradecemos al CONACYT la beca de la maestría otorgada a Hugo L. Gallardo Blanco y los apoyos brindados por la Dra. Agnes Revol de Mendoza y a la Dra. Martha Guerrero de Viader.

Resumen

La administración de BGhr al ganado bovino incrementa la tasa de crecimiento, la ganancia de peso y la producción de carne y leche. Como objetivo nos propusimos construir clonas de *P. pastoris* que portaran el ADNc de la BGH, y después valoramos su capacidad para producir ésta y secretarla al medio cultivo. Para esto se efectuó el diseño, síntesis y ensayo de oligonucleótidos que nos permitieron tanto amplificar por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) el ADNc de BGH como modificarlo para facilitar su inserción en un vector de integración (*pPIC9*) para *P. pastoris* (con el uso de la *Pfu* ADN polimerasa, con capacidad correctora). Se obtuvieron clonas de *E. coli* conteniendo el vector

construido (*pPIC9bGHPfu*) y que se caracterizaron enzimáticamente de forma exhaustiva. Se transformaron las levaduras con la técnica de esferoplastos, y después se caracterizaron las clonas obtenidas (con medios selectivos y con la PCR). Se observó que la producción de BGhr en las condiciones de fermentación ajustadas previamente para producir HGh22kDa en pequeña escala fue muy baja. Se experimentó con varias condiciones de fermentación y de diálisis, con lo que logramos incrementar la producción de BGhr; concluyendo que el pH, el porcentaje de metanol y la composición del medio de cultivo, así como el tiempo de fermentación son variables que afectan la producción de BGhr y su susceptibilidad a la proteólisis enzimática y/o fotoquímica.

Palabras clave: Somatotropina bovina, *Pichia pastoris*, Clonación, Fermentación.

Abstract

Administration of rBGH to cattle increases growth rate, weight gain and meat and milk production. The goals of this work were to construct *P. pastoris* clones carrying the cDNA of BGH and the evaluation of their capacity to produce and secrete the hormone in culture medium. Oligonucleotides were designed, synthesized and tested for the amplification of the DNAc of BGH by polymerase chain reaction (PCR) as well as to modify it to facilitate its insertion into an integration vector (*pPIC9*) for *P. pastoris* (using *Pfu* ADN polymerase, with proofreading capacity). Clones of *E. coli* containing the chimeric vector were obtained (*pPIC9bGHPfu*) and enzymatically characterized. The yeast was transformed by the spheroplast technique and the resulting clones were also characterized (with selective media and by PCR). The production of rBGH was very poor in the fermentation conditions previously adjusted in our laboratory to the production of human GH. We proceeded to test different fermentations and purification conditions and were able to improved rBGH. We conclude that the pH, the composition of the medium, percentage of methanol and fermentation time, are factors that affect rBGH production and its enzymatic and/or photochemical degradation.

Keywords: Bovine somatotropin, *Pichia pastoris*, Cloning, Fermentation.

Referencias

1. Li, C.H. and Evans, H.M. (1944). The isolation of pituitary growth hormone. *Science*. 99, 183-184: citado en: Felman, E.C. y Nelson, R.W.; 1987; *Growth Hormone on canine and feline endocrinology, and reproduction*; W.B. Saunders Co.; 29-54.
2. Press, M. (1988). Primary structure of bovine growth hormone. *Eur. J. Biochem.* 37, 164-170.
3. Roskman, W.G. and Rougeon, F. (1979). Molecular cloning and nucleotide sequence of the human growth hormone structural gene. *Nucleic Acid Res.* 7, 2:305-320.
4. Keshet, E., Rosner, A., Berstein, Y., Gorecki, M. and Aviv, H. (1981). Cloning bovine growth hormone gene and its expression in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 9, 19-21.
5. Kopehick, J.J., and Chen, W.Y. (1992). Growth hormone antagonist. Patente EUA 05350836.
6. Carlacci, L., Chou, K.C., Maggiora, G.M. (1991). A heuristic approach to predicting the tertiary structure of bovine somatotropin. *Biochemistry*. 7; 30 (18): 4389-4398.
7. Austin, C.L., Schingoethe, D.J., Casper, D.P. and Cleale, R.M. (1991). Influence of bovine somatotropin and nutrition on production and composition of milk from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:3920-39.32.
8. Silvia, W.J., R.W. Hemken and Halter, T.B. (2001). Timing of onset of somatotropin supplementation on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 384-389.
9. Gallardo-Blanco, H.L. (1999a). Construcción de cepas de *Pichia pastoris* portadoras del ADNc de la hormona del crecimiento bovino. Tesis de maestría, Facultad de Medicina, UANL.
10. Sánchez-Domínguez, C.N. (1998). Construcción de cepas *Pichia pastoris* productoras de hormona del crecimiento humana recombinante y evaluación de esquemas de purificación. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, UANL.
11. Gallardo-Blanco, H.L. (1999b). Hormonas de crecimiento recombinantes (S.II.3). VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. ULIEG, Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UANL.
12. Gallardo-Blanco, H.L. (1999c). Construcción de cepas de *Pichia pastoris* portadoras del DNAc de la hormona del crecimiento bovino. (P.II.21). VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. ULIEG, Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UANL.
13. Gallardo-Blanco, H.L. (1999d). Producción de BGHr en *Pichia pastoris*. Exposición oral. XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, ULIEG, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UANL.
14. Gallardo-Blanco, H.L. (1999e). Amplificación y clonación del DNAc de bGH con las polimerasas termoestables *Taq* y *Pfu*. Exposición en cartel. XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, ULIEG, Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UANL.